

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-139457

(P2000-139457A)

(43)公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51)Int.Cl.
C 12 N 9/12
1/21
15/09
// (C 12 N 9/12
C 12 R 1:92)

識別記号

F I
C 12 N 9/12
1/21
15/00

Z NA

テマコード(参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 5 0
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数13 O.L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-319241

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(22)出願日 平成10年11月10日 (1998.11.10)

(72)発明者 荒川 琢

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型逆転写酵素

(57)【要約】

【課題】従来よりもより高い温度域において反応でき
る、完全長のcDNAが取得するのに十分な伸長性の高
い逆転写酵素を提供する。

【解決手段】野生型に比して、特に42~60°Cの範囲
で伸長性を向上せしめたモロニーマウス白血病ウイルス
(MMLV)に由来する変異型逆転写酵素。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 野生型に比して伸長性が向上したこととする変異型逆転写酵素。

【請求項2】 伸長性が42～60°Cの範囲で向上した請求項1記載の変異型逆転写酵素。

【請求項3】 RNase H活性を実質的に有していない請求項1または2に記載の変異型逆転写酵素。

【請求項4】 Tyr Met Asp Aspで表されるアミノ酸配列を含む請求項1～3のいずれかに記載の変異型逆転写酵素。

【請求項5】 モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)に由来する請求項1～4のいずれかに記載の変異型逆転写酵素。

【請求項6】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる請求項5記載の変異型逆転写酵素。

【請求項7】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することを特徴とするDNAフラグメント。

【請求項8】 配列番号2に記載されるスクレオチド配列を含む請求項7記載のDNAフラグメント。

【請求項9】 請求項7または8に記載のDNAフラグメントをベクターに挿入したことを特徴とするDNA組換えベクター。

【請求項10】 請求項9記載のDNA組換えベクターを用いて形質転換されたことを特徴とする組換え宿主細胞。

【請求項11】 宿主細胞がエシレリヒア・コリ(Escherichia coli)である請求項10記載の組換え宿主細胞。

【請求項12】 請求項10または11に記載の組換え宿主を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする変異型逆転写酵素の製造方法。

【請求項13】 請求項1～6のいずれかに記載の変異型逆転写酵素を用い、かつRNAを錆型とすることを特徴とするcDNAの合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は伸長性特に高温域での伸長性に優れた逆転写酵素、該逆転写酵素をコードする遺伝子および該遺伝子を使用する該逆転写酵素の製造方法ならびに該逆転写酵素を利用したcDNAの合成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来からレトロウイルス、特にモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)やヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV)、トリ骨髄芽症ウイルス(AMV)由来の逆転写酵素については多くの研究がなされ、様々な機能、性質が知られてきている。加えて、RNAを錆型としてこれに相補的なDNA(cDNA)を合成することができるという特徴的な性質により、多くの分

子生物学的手法、例えばcDNAライブラリーの構築、RT-PCRなどに用いられている。mRNAの塩基配列は、発現されている蛋白質のアミノ酸配列を反映していることから、その解析の意義は遺伝子産物の機能を知る上で非常に大きい。

【0003】一方、これまでに報告されているレトロウイルス由来の逆転写酵素の多くが、DNA-RNAハイブリッド2本鎖のRNAを分解する活性、すなわちRNase H活性を有することが知られている。この活性の存在は、cDNAを合成する際に錆型-プライマー複合体の錆型を分解し、その分解位置がプライマーの3'端に近い場合は、錆型-プライマー複合体が解離されるため伸長性が低下するという結果を招く。このような問題を排除するため、実質的にRNase H活性を有していない逆転写酵素が開発されてきた。

【0004】モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)由来の逆転写酵素は、そのアミノ酸配列の相同性および様々な機能解析から、その蛋白質のC末端側約200残基がRNase H活性を担うドメインであることが

20 知られている(Reversetranscriptase, Cold Spring Harbor Monograph第135～162頁、1993年)。現在、RNase H活性を欠失したMMLV由来の逆転写酵素としては、RNase Hドメインのアミノ酸を削除したデリーション型が東洋紡績から、アミノ酸の置換により機能を失した点変異型がスーパースクリプトIIという商品名でライフテクノロジー社から入手することができる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの逆転写酵素をもってしても完全長のcDNAが取得できない場合がある。その理由としては、錆型RNAの配列に起因する高次構造のため逆転写酵素の結合が阻害される、あるいは合成途上のDNA鎖の3'末端に錆型RNAと相補的でないスクレオチドが取り込まれ伸長反応が阻害されるといったことが考えられている。そのため、従来のものよりも、より高い温度域において反応できる伸長性の高い逆転写酵素の開発が待ち望まれていた。

【0006】

40 【課題を解決するための手段】これまで報告されている逆転写酵素のアミノ酸配列はいくつかの共通の保存領域を有するが、その中でもTyr(タイロシン)-X-Aasp(アスパラギン酸)-Asp(アスパラギン酸)で表される配列はほとんどの逆転写酵素に存在する。Xについては様々なバリエーションがあり、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)カリフラワーモザイクウイルス(CAMV)ではバリン、ヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV)、ラウスサルコーマウイルス(RSV)ではメチオニンなどである。この領域は結晶構造解析などから2価金属イオンの結合部位として機能することが

知られており、酵素活性の発現に重要な役割を果たしている (Structure 第15巻、第879~892頁、1995年)。

【0007】さらに最近になって、Xのアミノ酸の種類がHIV由来の逆転写酵素の伸長性に大きく関与しているという報告がなされた。すなわち、HIV由来の逆転写酵素の野生型はXの位置にメチオニンをもつが、これをバリンあるいはスレオニンに変換すると、铸型に対して誤ったヌクレオチドが取り込まれた(ミスインコードレーションされた)伸長鎖の3'端を伸長する能力が低下するという現象が報告されている (Nucleic Acids Research 第25巻、第3212~3217頁、1997年)。

【0008】本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意検討の結果、MMLV由来の逆転写酵素にポイントミューテーションによる改良を加えることにより、野生型の該逆転写酵素に比して伸長性、耐熱性を向上することができるを見出し、本発明に到達した。その具体的な例としては、MMLV由来の逆転写酵素の584番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換するアミノ酸変異を加え、RNase H活性を消失したのに、さらに上述の保存領域のXに相当する224番目のバリンをメチオニンに置換するアミノ酸変異を加えることにより、cDNA合成の伸長性が、従来の反応温度領域である42°Cから従来は反応性に乏しかった60°Cの間で向上せしめるものである。

【0009】すなわち、本発明は以下の構成からなる。

- (1) 野生型に比して伸長性が向上したことを特徴とする変異型逆転写酵素。
- (2) 伸長性が42~60°Cの範囲で向上した(1)の変異型逆転写酵素。
- (3) RNase H活性を実質的に有していない(1)または(2)の変異型逆転写酵素。
- (4) Tyr Met Asp Aspで表されるアミノ酸配列を含む(1)~(3)のいずれかの変異型逆転写酵素。
- (5) モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)に由来する(1)~(4)のいずれかの変異型逆転写酵素。
- (6) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる(5)の変異型逆転写酵素。
- (7) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することを特徴とするDNAフラグメント。
- (8) 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列を含む(7)のDNAフラグメント。
- (9) (7)または(8)のDNAフラグメントをベクターに挿入したことを特徴とするDNA組換えベクター。
- (10) (9)のDNA組換えベクターを用いて形質転換されたことを特徴とする組換え宿主細胞。

(11)宿主細胞がエシレリヒア・コリ (Escherichia coli) である(10)の組換え宿主細胞。

(12) (10)または(11)の組換え宿主を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする変異型逆転写酵素の製造方法。

(13) (1)~(6)いずれかの変異型逆転写酵素を用い、かつRNAを録型とすることを特徴とするcDNAの合成方法。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明における変異型逆転写酵素は、野生型に比してcDNA合成の伸長性が向上したことを特徴とするものである。特に42~60°Cの範囲において、すなわち、従来の反応温度領域である42°Cから、従来は反応性に乏しかった60°Cまでの間で向上したものである。ここで、逆転写酵素の伸長性とは、より長いcDNAを合成する能力のことという。また、変異型逆転写酵素とは、野生型逆転写酵素に対しアミノ酸の置換、欠失、挿入等の変異操作を行うことにより得られるものをいう。

【0011】本発明における変異型逆転写酵素は、好適にはRNase H活性を実質的に有していない。ここで、RNase H活性を実質的に有していないとは、逆転写活性1ユニットにつきRNase H活性10^-10ユニット以下のものをいう。

【0012】本発明における逆転写酵素の好適な例としては、Tyr Met Asp Aspで表されるアミノ酸配列を含んでいる。該アミノ酸配列を有する逆転写酵素は、例えば、MMLV由来の逆転写酵素にアミノ酸変異を導入することにより得ることができる。本発明においてアミノ酸変異の導入は、当業者がなし得る方法であればいかなる方法でもよい。例えば、サイトディレクテッドミュータジネシス法が挙げられる (Methods Enzymol. 第154巻、第382頁、1987年)。

【0013】本発明のDNAフラグメントは、伸長性の向上した変異型逆転写酵素をコードするDNAであり、該DNAフラグメントの一例は配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する。また、このようなDNAは配列番号2記載される塩基配列またはその一部分を含有する。

【0014】さらに本発明のDNA組換えベクターは、上記DNAフラグメントをベクターに挿入することにより得られるものである。該ベクターは、変異型逆転写酵素のクローニング及び発現を可能とするものであればいかなるものでもよく、例えばファージ及びプラスミドが挙げられる。プラスミドとしてはpUC118, pUC18, pBR322, pBluescript, pLE D-M1, p73, pGW7, pET3a, pET8cなどが挙げられる。一方、ファージとしては例えはλgt11, λZAP IIなどが挙げられる。

【0015】また本発明の組換え宿主細胞は、上記DN

A組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換することにより得られるものである。該宿主細胞としては、大腸菌、酵母などが挙げられが、特に大腸菌が好ましい。大腸菌としては、例えばエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) DH5 α 、JM109、HB101、XL1Blue、PR1、HS641 (DE3)、BL21 (DE3) などが挙げられる。すなわち、本発明においては、上記の伸長性の向上した変異型逆転写酵素をコードする遺伝子を上記ベクターに挿入してDNA組換えベクターとし、さらに該組換え発現ベクターにて宿主細胞を形質転換する。

【0016】また、本発明における変異型逆転写酵素の製造方法は、上記組換え宿主細胞を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする。該組換え宿主細胞の培養に使用する培地ならびに条件は常法に従う。具体例としては、伸長性の向上した変異型逆転写酵素遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された大腸菌を、例えばTB培地にて培養することにより、該変異型逆転写酵素を得ることができる。

【0017】上記変異型逆転写酵素の精製方法としては、例えば、(a)組換え宿主を集めた後、破碎して、細胞抽出物を調製し、(b)宿主細胞由来の不純蛋白質を除去する工程を含む。組換え宿主細胞より産出された伸長性の向上した変異型逆転写酵素は、宿主菌体を培地で培養後、培養液から遠心分離等にて分離・回収する。該菌体を緩衝液に再懸濁した後、超音波処理、ダイノミル・フレンチプレンス等により菌体を破碎する。

【0018】次いで、カラムクロマトグラフィーを実施し、伸長性の向上した変異型逆転写酵素を回収する。カラムクロマトグラフィーは、陽イオン交換体、例えばフォスフォセルロース、あるいは疎水性吸着体、例えばブチルセファロース、あるいはアフィニティ吸着体へパリンセファロースなどが好ましい。

【0019】上記のようにして取得した伸長性の向上した変異型逆転写酵素の分子量は、好ましくは約74KD α である。

【0020】本発明における変異型逆転写酵素を用いることにより、RNAを錆型とし、より長いcDNAを合成することを可能とする。本発明における変異型逆転写酵素を用いて合成可能なcDNAの長さは、その反応条件等によっても異なるが、少なくとも9.4kb以上の伸長が可能であり、条件次第では従来の逆転写酵素を用いては実現出来なかった14kb以上の伸長も可能とする。本発明の変異型逆転写酵素を用いた場合、同一の条件で従来の野生型の逆転写酵素を用いた場合とその伸長性を対比した場合、2倍以上の伸長性を増大することができる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0022】実施例1 MMLV逆転写酵素への点突然変異の導入

野生型MMLV逆転写酵素発現プラスミドpRT30-2はコロンビア大学・ゴフ教授より分譲入手した。

【0023】点突然変異の導入はトランスフォーマーキット（クロントック製）を用い、説明書の指示に従って行った。2種の制限酵素選択プライマーおよび2種の変異導入プライマー（配列番号3、4、5、6）を合成した。配列番号3はベータラクタマーゼ遺伝子中のScal

I部位をM1uIに変換するプライマーである。配列番号4は上記で変換されたベータラクタマーゼ遺伝子中のM1uI部位をScalIに変換するプライマーである。配列番号5はMMLV逆転写酵素遺伝子中の670番目のグアニンをアデニンに変換する（すなわち、アミノ酸配列の224番目のバリンをメチオニンに変換する）プライマーである。配列番号6はMMLV逆転写酵素遺伝子中の1750番目のグアニンをアデニンに変換する（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変換する）プライマーである。

【0024】それぞれのプライマー200pmolを1mM ATP、5ユニット ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡績製）を含むキナーゼバッファー中、37°Cで30分間インキュベートし、5'末端をリン酸化した。その後、75°Cで15分間インキュベートしてポリヌクレオチドキナーゼを失活させた。

【0025】pRT30-2 0.1 μ g、5'末端をリン酸化した配列番号3および6のプライマーをそれぞれ10pmol、上記キット添付のアニーリングバッファー2 μ lを含む20 μ lの溶液を、100°Cで3分間インキュベートした後、直ちに5分間氷冷した。

【0026】これに蒸留水5 μ l、キット添付のシンセシスバッファー3 μ l、T4リガーゼ1 μ l、T4DNAポリメラーゼ1 μ lを加え、37°Cで1時間インキュベートした後、75°Cで15分間インキュベートし酵素を失活させた。これにHバッファー3 μ l、Scal20ユニットを加え37°Cで2時間インキュベートした。

【0027】このうち1 μ lをエシェリヒア・コリBMH71-18株コンビテントセル100 μ lに加え、30分間氷冷した後、42°Cで30秒間インキュベートし、900 μ lのSOC培地を加え37°Cで1時間インキュベートした。これに50 μ g/mlのアンビシリンを含むLB培地5mlを加え、37°Cで一晩インキュベートした。

【0028】上記のようにして得られた菌体から定法によりプラスミドを抽出し、そのうち50ngにScal10ユニット、Hバッファー2 μ lを加え全量を20 μ lとし、37°Cで2時間インキュベートした。この反応液2 μ lをエシェリヒア・コリDH5 α コンビテントセルに加えて、定法に従い形質転換した。

【0029】上記のようにして得られたコロニーをLB

培地2. 5 mlに懸濁し、一晩培養した後、定法に従いプラスミドを抽出した。このプラスミドがMlu Iで切断されるものについて塩基配列をサンガーフラッシュ法で確認し、MMLV逆転写酵素遺伝子中の1747番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変換されている）プラスミドpD584Nを取得した。

【0030】上記と同様にして、配列番号5のプライマーを用い、MMLV逆転写酵素遺伝子中の670番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の223番目のバリンがメチオニンに変換されている）プラスミドpV224Mを取得した。

【0031】また、pD584Nをもとに配列番号4および5のプライマーを用い1750番目のグアニンがアデニンに変換され（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変換される）、かつ670番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の224番目のバリンがメチオニンに変換されている）プラスミドpDNVMを取得した。

【0032】実施例2 形質転換体の作製

実施例1で得られた各プラスミド1ngをエシェリヒア・コリDH5α100μlに加え、30分間氷冷した後、42℃で30秒間インキュベートし、900μlのSOC培地を加え37℃で1時間インキュベートした。これを50μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上にて37℃で一晩インキュベートし、形質転換体を得た。

【0033】実施例3 形質転換体の培養

実施例2で得られた各形質転換体を100μg/mlのアンピシリンを含むTB培地100mlに懸濁し、37℃で一晩インキュベートした。得られた菌体を12,000回転/分で5分間遠心分離することにより回収した。

【0034】実施例4 MMLV逆転写酵素の精製

実施例3で得られたそれぞれの菌体について以下の操作*

蒸留水

5×1st strand synthesis buffer

10mM dNTP

(α-32P) dTTP (370 kBq/μl)

RNA Ladder

100 pmol/μl (dT) 30

RNAse Inhibitor (20 units/μl)

逆転写酵素 (10 units/μl)

12 μl

2.0 μl (LifeTech製)

2.0 μl

1.0 μl

0.5 μl (LifeTech製)

1.0 μl

0.5 μl

1.0 μl

mM EDTA, 0.05%BPB, 20%グリセロールを4μl加えて反応終了後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルドライヤーにてゲルを乾燥した後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、V224M+D584Nで合成を行ったものは42℃から60℃の間で他の酵素に比べ、より長いcDNAの伸長

*を行った。菌体10gをバッファー1（20mMトリス-塩酸（pH7.5）、5mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、100mM塩化ナトリウム）20mlに懸濁した。これを超音波破碎機で破碎し、12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離した。得られた上清に0.6%ポリエチレンイミン溶液を0.4ml添加し、30分間攪拌した。これを12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離し回収した。

【0035】得られた沈殿をバッファー2（20mMトリス-塩酸（pH7.5）、0.1mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、50mM塩化ナトリウム、10%グリセロール）5mlに溶解し、100mlのバッファー2に対して透析した。これをDEAEセファロースカラム（5ml）にチャージし、非吸着画分を回収した。これをフォスフォセルロースカラム（5ml）にチャージし、10mlのバッファー2で洗浄後、0~500mM NaClのグラジェントバッファー2 40mlで溶出した。

【0036】得られたフラクションのうち、逆転写酵素活性を含みRNase H活性を有していない画分をブルーした。次いで、これをヘパリンセファロースカラム（3ml）に供し、0~1M NaClのグラジェントバッファー2により溶出し、逆転写酵素活性を含む画分を回収した。以上の操作により、SDS-PAGEにおいてほぼ単一なバンドを示す10mgの蛋白質を得た。pD584Nを有する菌体から得られた蛋白質をD584N、pV224Mを有する菌体から得られた蛋白質をV224M、pDNVMを有する菌体から得られた蛋白質をV224M+D584Nとした。

【0037】実施例5 cDNA合成伸長能力の比較

下記の組成物を調製した。

【0038】比較のため、逆転写酵素は野生型、RNase H欠失型（東洋紡績製）、Superscript II（LifeTech製）および実施例4で得られたV223M+D583Nを用いた。これを42℃、50℃、55℃、60℃で1時間インキュベートした。停止液（20mM Tris-HCl（pH8.0）、10

が観察された。

【0039】実施例6 RT-PCRによるcDNA合成伸長能力の比較

ヒトジストロフィンのmRNAは約14kbの長さを持つことが知られている。配列番号7に示されるオリゴヌクレオチドはこのmRNAの3'端に相補的に結合するように設計されている。このプライマーを用いてcDNA合成反応を行った後、配列番号8および9に示される*

*プライマーセットを用いPCRを行った。このプライマーセットはmRNAの5'端約400bpを増幅するよう設計されており、cDNA合成が5'端まで到達していれば増幅が確認できる。

【0040】cDNA合成反応は以下の反応液を調製し、42°Cで30分インキュベートすることにより行った。

【0041】

蒸留水	11μl
5×1st strand synthesis buffer	4.0μl (東洋紡績製)
10mM dNTP	2.0μl
ヒト骨格筋polyA+RNA (0.1μg/μl)	1.0μl (CloneTech 製)
プライマー配列番号7 (10pmol/μl)	1.0μl
逆転写酵素 (100units/μl)	1.0μl

【0042】PCRは以下の反応液を調製し、98°Cで30秒、68°Cで30秒の熱サイクルを30回繰り返す※

【0043】

蒸留水	7.0μl
10×KOD dash buffer	2.0μl (東洋紡績製)
cDNA合成反応液	8.0μl
プライマー配列番号8 (10pmol/μl)	1.0μl
プライマー配列番号9 (10pmol/μl)	1.0μl
KOD dash (2.5units/μl)	1.0μl (東洋紡績製)

【0044】熱サイクル終了後、反応液5μlをアガロースゲル電気泳動に供し、増幅産物を検出した。その結果、図2に示されるようにV224M+D584NでcDNA合成を行ったものは増幅産物が確認され、約14kbのcDNAが合成されていることが示唆されたが、野生型およびスーパースクリプトIIにおいては増幅産物が観察されなかった。これよりV224M+D584Nはこれらの酵素に比べて、より長いcDNAの伸長が可能であることが示唆された。

★【0045】

【発明の効果】上述したように、本発明における伸長性の向上した変異型逆転写酵素は、42~60°Cの間で野生型および従来のRNaseH欠失型の逆転写酵素に比べて、伸長性が向上しており、完全長cDNAを合成するのに適した酵素である(図1参照)。

【0046】

【配列表】

★

配列番号1

配列の長さ: 672 (アミノ酸)

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

MET	Thr	Leu	Asn	Ile	Glu	Asp	Glu	His	Arg	Leu	His	Glu	Thr	Ser	Lys
1				5					10				15		
Glu	Pro	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Trp	Leu	Ser	Asp	Phe	Pro	Gln
									20				25		30
Ala	Trp	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	MET	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
									35			40		45	
Leu	Ile	Ile	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Lys	Gln
									50			55		60	
Tyr	Pro	MET	Ser	Gln	Glu	Ala	Arg	Leu	Gly	Ile	Lys	Pro	His	Ile	Gln
									65			70		75	80
Arg	Leu	Leu	Asp	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Pro	Cys	Gln	Ser	Pro	Trp	Asn
									85			90		95	
Thr	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Thr	Asn	Asp	Tyr	Arg	Pro

11

12

100	105	110	
Val Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro			
115	120	125	
Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His			
130	135	140	
Gln Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg			
145	150	155	160
Leu His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro			
165	170	175	
Glu MET Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly			
180	185	190	
Phe Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu			
195	200	205	
Ala Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Gln Tyr MET			
210	215	220	
Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly			
225	230	235	240
Thr Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser			
245	250	255	
Ala Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr			
260	265	270	
Leu Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr			
275	280	285	
Val MET Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe			
290	295	300	
Leu Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu			
305	310	315	320
MET Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn			
325	330	335	
Trp Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu			
340	345	350	
Leu Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu			
355	360	365	
Leu Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln			
370	375	380	
Lys Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu			
385	390	395	400
Asp Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg MET Val Ala Ala			
405	410	415	
Ile Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr MET Gly Gln Pro			
420	425	430	
Leu Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro			
435	440	445	
Pro Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg MET Thr His Tyr Gln Ala Leu			
450	455	460	
Leu Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn			
465	470	475	480
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys			
485	490	495	
Leu Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp			

13	500	505	510	14
Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser				
	515	520	525	
Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu				
	530	535	540	
Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln				
	545	550	555	560
Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys MET Ala Glu Gly				
	565	570	575	
Lys Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala				
	580	585	590	
His Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu				
	595	600	605	
Gly Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala				
	610	615	620	
Leu Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln				
	625	630	635	640
Lys Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg MET Ala Asp Gln Ala				
	645	650	655	
Ala Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu				
	660	665	670	

【0047】

配列番号2

配列の長さ: 2019

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源: Molony Murine Leukemia Virus

配列

```

ATG ACC CTA AAT ATA GAA GAT GAG CAT CGG CTA CAT GAG ACC TCA AAA 48
GAG CCA GAT GTT TCT CTA GGG TCC ACA TGG CTG TCT GAT TTT CCT CAG 96
GCC TGG CGG GAA ACC GGG CCC ATG GCA CTG GCA GTT CCC CAA GCT CCT 144
CTG ATC ATA CCT CTG AAA GCA ACC TCT ACC CCC GTG TCC ATA AAA CAA 192
TAC CCC ATG TCA CAA GAA GCC AGA CTG GGG ATC AAG CCC CAC ATA CAG 240
AGA CTG TTG GAC CAG GGA ATA CTG GTA CCC TCC CAG TCC CCC TGG AAC 288
ACG CCC CTG CTA CCC GTT AAG AAA CCA GGG ACT AAT GAT TAT AGG CCT 336
GTC CAG GAT CTG AGA GAA GTC AAC AAG CGG GTG GAA GAC ATC CAC CCC 384
ACC GTG CCC AAC CCT TAC AAC CTC TTG AGC GGG CTC CCA CCG TCC CAC 432
CAG TGG TAC ACT GTG CTT GAT TTA AAG GAT GCC TTT TTC TCC CTG AGA 480
CTC CAC CCC ACC AGT CAG CCT CTC TTC GCC TTT GAG TGG AGA GAT CCA 528
GAG ATG CGA ATC TCA CGA CAA TTG ACC TGG ACC AGA CTC CCA CAG GGT 576
TTC AAA AAC AGT CCC ACC CTG TTT GAT GAG GCA CTG CAC AGA GAC CTA 624
GCA GAC TTC CCG ATC CAG CAC CCA GAC TTG ATC CTG CTA CAG TAC ATG 672
GAT GAC TTA CTG CTG CCC ACT TCT GAG CTA GAC TCC CAA CAA CGT 720
ACT CGG CCC CTG TTA CAA ACC CTA CGG AAC CTC CGG TAT CGG GCC TCG 768
GCC AAG AAA GCC CAA ATT TCC CAG AAA CAG GTC AAG TAT CTG GGG TAT 816
CTT CTA AAA GAG GGT CAG AGA TGG CTG ACT GAG GCC AGA AAA GAG ACT 864
GTC ATG CGG CAG CCT ACT CGG AAG ACC CCT CGA CAA CTA AGG GAG TTC 912
CTA GGG ACG GCA CGC TTC TGT CGC CTC TGG ATC CCT CGG TTT GCA GAA 960

```

15

ATG GCA CCC CCC TTG TAC CCT CTC ACC AAA ACG CGG ACT CTG TTT AAT 1008
 TGG GGC CCA GAC CAA CAA AAG GCC TAT CAA GAA ATC AAG CAA GCT CTT 1056
 CTA ACT CCC CCA CCC CTG CGG TTG CCA GAT TTG ACT AAG CCC TTT GAA 1104
 CTC TTT GTC GAC GAG AAG CAG CGG TAC GCC AAA GGT GTC CTA ACC CAA 1152
 AAA CTG GGA CCT TGG CGT CGG CGG GTG GCC TAC CTG TCC AAA AAG CTA 1200
 GAC CCA GTC GCA GCT CGG TGG CCC CCT TGC CTA CGG ATG GTA GCA GCC 1248
 ATT GCC GTA CTG ACA AAG GAT GCA GCC AAG CTA ACC ATG GCA CAG CCA 1296
 CTA GTC ATT CTG GCC CCC CAT GCA GTA GAG GCA CTA GTC AAA CAA CCC 1344
 CCC GAC CCC TCG CTT TCC AAC GCC CGG ATG ACT CAC TAT CAG GCC TTG 1392
 CTT TTG GAC ACG GAC CGG GTC CAG TTC GGA CGG GTG GTA GCC CTG AAC 1440
 CCG GCT ACG CTG CTC CCA CTG CCT GAG GAA CGG CTG CAA CAC AAC TGC 1488
 CTT GAT ATC CTG GCC GAA GCC CAC CGA ACC CGA CCC GAC CTA ACC GAC 1536
 CAC CGG CTC CCA GAC CCC GAC CAC ACC TGG TAC ACC GAT CGA AGC AGT 1584
 CTC TTA CAA GAG GGA CAG CGT AAG CGG GGA GCT GCG GTG ACC ACC GAG 1632
 ACC GAG GTA ATC TGG GCT AAA GCC CTG CCA GCC CGG ACA TCC GCT CAG 1680
 CGG GCT GAA CTG ATA GCA CTC ACC CAG CCC CTA AAG ATG GCA GAA GGT 1728
 AAG AAG CTA AAT GTT TAT ACT AAT ACC CGT TAT GCT TTT GCT ACT GCC 1776
 CAT ATC CAT GGA GAA ATA TAC AGA AGC CGT GGG TTG CTC ACA TCA GAA 1824
 GCC AAA GAG ATC AAA AAT AAA GAC GAG ATC TTG GCC CTA CTA AAA GCC 1872
 CTC TTT CTG CCC AAA AGA CTT ACC ATA ATC CAT TGT CCA GGA CAT CAA 1920
 AAG GGA CAC ACC GCC GAG CCT AGA GCC AAC CGG ATG CCT GAC CAA CGG 1968
 GCC CGA AAG GCA GCC ATC ACA GAG ACT CCA GAC ACC TCT ACC CTC CTC 2016
 TAG 2019

【0048】配列番号3

配列の長さ：27

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CTG TCA CTG CTG ACG CGT CAA CCA ACT

【0049】配列番号4

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CCT TTT CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA ACT C

【0050】配列番号5

配列の長さ：25

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

GTA AGT CAT CCA TGT ACT GTC GCA G

【0051】配列番号6

配列の長さ：28

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CAT AAC GCC TAT TAG TAT AAA CAT TTA G

【0052】配列番号7

30 配列の長さ：38

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

TTC AGT TAC ATT ATG ATT TAC AGT TTA ATA CTC CGT GG

【0053】配列番号8

配列の長さ：25

配列の型：核酸（DNA）

40 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CCT ACT GGA GCA ATA AAG TTT GAA G

【0054】配列番号9

配列の長さ：23

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

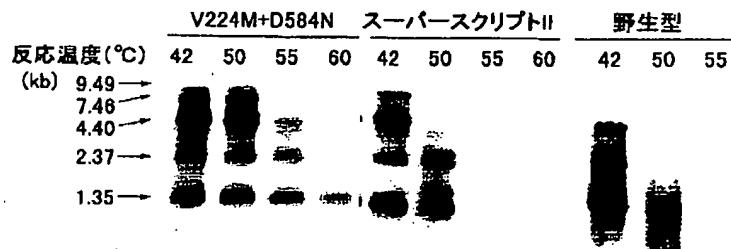
CCA TCT ACG ATG TCA GTA CTT CC

【図面の簡単な説明】

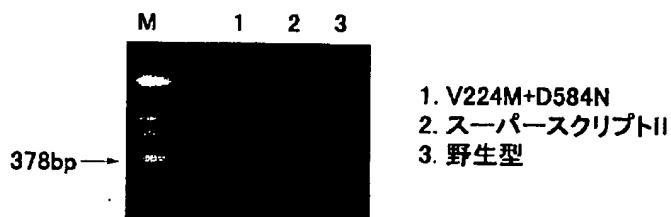
【図1】 野生型、従来のRNase H欠失型、スーパースクリプトII

* スクリプトIIおよびV224M+D584NのcDNA
A合成反応における伸長性を示した図である。【図2】 ジストロフィンmRNAを標的とした、RT
-PCR増幅産物の電気泳動図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.C1.⁷ 識別記号 F I テーマコード (参考)

(C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 15/09 ZNA
 C 1 2 R 1:92)

(72) 発明者 川村 良久
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
 式会社敦賀バイオ研究所内

F ターム (参考) 4B024 BA10 CA04 DA06 HA08
 4B050 CC03 DD01 FF04E FF05E
 FF11E FF14E
 4B065 AA26X AA95Y AB01 BA02
 CA29 CA44 CA60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.